

Boletim de Pesquisa 218
e Desenvolvimento

ISSN 1676 - 340
Agosto, 2008

**Identificação Molecular de Linhagens
de Fungos Pertencentes aos Gêneros
Aspergillus, Penicillium e Fusarium
Utilizando Marcadores RAPD**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 218

**Identificação Molecular de Linhagens de
Fungos Pertencentes aos Gêneros
Aspergillus, *Penicillium* E *Fusarium*
Utilizando Marcadores RAPD**

Anabele A Lima
Paulo Roberto Queiroz
Carlos Fernando Santos
Valdi Lopes Tutunji
Sueli Corrêa Marques de Mello
Luzia Helena Corrêa Lima

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2008

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão*

Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

-
- I 19 Identificação molecular de linhagens de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* utilizando marcadores RAPD. / Anabele A. Lima... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 218).

1. Fungo. 2. Identificação. 3. Microrganismo. I. Lima, A. A. II. Série.

632.4 – CDD 21

© Embrapa, 2008.

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
Materiais e Métodos	12
Análise dos Dados	16
Conclusão	24

Identificação Molecular de Linhagens de Fungos Pertencentes aos Gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* Utilizando Marcadores RAPD

*Anabele A Lima*¹

*Paulo Roberto Queiroz*²

*Carlos Fernando Santos*³

*Valdi Lopes Tutunji*⁴

*Sueli Corrêa Marques de Mello*⁵

*Luzia Helena Corrêa Lima*⁶

RESUMO

Coleções de culturas de microorganismos apresentam importante contribuição para a preservação, manutenção e suprimento de culturas autênticas. Garantem, também, um estrito controle de qualidade para a aquisição e depósito em bancos de microorganismos. Entre as linhagens de fungos, de interesse nas áreas industrial, farmacêutica e de alimentos, estão os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Os avanços da tecnologia informatizada e também da biologia molecular, associadas à grande diversidade microbiológica existente e inexplorada, deverão proporcionar novas aplicações biotecnológicas destes microorganismos. A identificação e caracterização microbiológica, somada às técnicas moleculares asseguram um resultado seguro com relação à classificação e definição de novos táxons e garante a qualidade dos bancos de microorganismos. A utilização do marcador molecular RAPD, apesar de apresentar algumas limitações, tem-se mostrado útil nos estudos de microorganismos onde não se tem muita informação genética. Desse fato, surgiu o principal objetivo do trabalho que foi o de caracterizar o perfil molecular e identificar marcadores RAPD específicos para linhagens de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, no intuito de contribuir com estudos filogenéticos, utilizados para determinar a origem comum entre as espécies.

¹ Bióloga, Pós-graduada em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, CEP. 70.910-900, Brasília, DF. E.mail: queiroz@cenargen.embrapa.br

² Biólogo, Dr., Professor, Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. CEP 70.000-000, Brasília, DF. E.mail: queiroz@cenargen.embrapa.br

³ Graduando, Biomedicina, Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. CEP 70.000-000, Brasília, DF. E.mail: queiroz@cenargen.embrapa.br

⁴ Biólogo, MSc., Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Professor, Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. CEP 70.000-000, Brasília, DF. E.mail: queiroz@cenargen.embrapa.br

⁵ Engenheira Agrônoma, Dra., Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: smello@cenargen.embrapa.br

⁶ Bióloga, Dra., Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: luzia@cenargen.embrapa.br

ABSTRACT

*Microorganisms' cultures collections present important contribution for the preservation, maintenance and supply of authentic cultures to the researchers. As well, assures a strict control for the acquisition and deposit in the banks of microorganisms and supply subsidies for the researches carried out in a scientific institution. Among the interest of fungi lineages in the industrial and pharmaceutical area and also food stuffs, they are the fungi belonging to the genus *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. The identification and microbiological characterization and the use of molecular techniques can contributed with the classification and definition of new táxons. The molecular marker RAPD, despite of some limitations, have shown helpful in the studies of microorganisms where does not have a lot genetic information. That work had as main objective, determine the molecular profile and identify RAPD specific markers for lineages of fungi belonging to the genus *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, in order to contribute to the philogenetic studies, used to determine the common origin among the species.*

Introdução

Entre vários países, o Brasil participou das negociações feitas com relação à convenção sobre a diversidade biológica, assinada no Rio de Janeiro em 1992, visando à conservação da diversidade biológica, a utilização sustentável dos seus componentes e a partilha justa e eqüitativa dos benefícios provenientes da utilização dos recursos genéticos. Sendo assim, a Convenção é o primeiro acordo que engloba todos os aspectos da diversidade biológica, tais como, genomas e genes, espécies e comunidades, habitats e ecossistemas (Brasil, 2005).

Coleções de culturas de microrganismos apresentam importante contribuição para a preservação, manutenção e suprimento de culturas autênticas aos pesquisadores. Garantem, também, um estrito controle de qualidade para a aquisição e depósito em seus bancos de microrganismos. Coleções de culturas são, ainda, centros de conservação com a função de coletar organismos de interesse para estudos científicos e aplicações tecnológicas, tornando-os disponíveis para usuários interessados. A fim de garantir a sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados, os métodos de preservação e armazenamento devem ser criteriosamente selecionados, desta forma, garantindo ainda a manutenção das características genéticas e suas propriedades morfológicas e fisiológicas.

Com esta visão, as coleções de culturas fazem parte da integração da comunidade científica, visando à exploração das competências existentes e desenvolvendo tecnologias inovadas para coleta, gerenciamento, análise e compreensão dos diversos microrganismos. Uma das funções de uma coleção de microrganismos é fornecer subsídios para as pesquisas realizadas em uma instituição científica. Entre as linhagens de fungos potenciais alvos de estudo estão os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, visto que são fungos de interesse na área industrial, farmacêutica, de alimentos, médica e agrônômica, entre outras. Estes são microrganismos que se caracterizam pela facilidade de isolamento, graças à capacidade de crescer em variados substratos e nichos ecológicos, bem como à facilidade de manipulação e manutenção em cultura.

A microbiologia teve, a partir do século XIX, um notável desenvolvimento dentro da patologia humana, veterinária e vegetal e na indústria de fermentações para produção de antibióticos, ácidos orgânicos, bebidas e álcool, entre outros. O reconhecimento da grande importância dos microrganismos para o homem levou ao aprimoramento das técnicas e métodos de isolamento e manutenção de novas culturas para fins de estudo de caracterização taxonômica ou ainda, para fins industriais, que conduziram à organização em diversos centros de pesquisa de vastas coleções de culturas de microrganismos vivos.

A identificação microbiológica decorre, inicialmente, de provas bioquímicas, porém o uso de técnicas de biologia molecular pode enriquecer o conhecimento a esse respeito, tendo como conseqüências um impacto significativo no nível de resolução taxonômica, na qualidade científica da pesquisa e na produtividade dos grupos de pesquisa, além de proporcionar soluções dos problemas de classificação, no que diz respeito à caracterização e à definição de novos táxons, em diversos grupos de microrganismos.

Segundo Manfio (2003), as coleções de referência de microrganismos têm sido apontadas como recursos importantes para o desenvolvimento de pesquisas em biodiversidade e sistemática.

No Brasil destacam-se algumas coleções de referência de fungos, como a Coleção de Culturas do Instituto de Botânica, em São Paulo, Coleção de Culturas DPUA (Universidade do Amazonas), Coleção de Culturas de Fungos Ectomicorrízicos do Departamento de Microbiologia (Universidade Federal de Santa Catarina), Coleção do Departamento de Micologia da FIOCRUZ, no Rio de Janeiro, Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco e Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT) (MANFIO, 2003).

Os avanços da tecnologia informatizada e também da biologia molecular, associadas à grande diversidade microbiológica existente e inexplorada, deverão proporcionar novas aplicações biotecnológicas destes microrganismos. Nos últimos anos, vêm sendo desenvolvidas técnicas baseadas na análise de ácidos nucléicos visando tanto estudos mais precisos da taxonomia quanto no estudo de fatores de controle da patogenicidade. Ao contrário dos métodos convencionais que contam com a reação de indução dos patógenos, essas técnicas proporcionam vantagens a fim de caracterizar, identificar e detectar microrganismos baseados na informação genômica (DUVEILLER et al., 1997).

Os microrganismos pertencentes ao reino Fungi caracterizam-se por serem organismos eucarióticos, cujos núcleos são dispersos em um micélio, ou seja, um conjunto de hifas. Eles obtêm sua nutrição através da absorção e são organismos que não apresentam plastos ou pigmentos fotossintéticos. Os predominantes são os do tipo filamentosos, porém algumas espécies apresentam características leveduriformes (CHALFOUN e BATISTA, 2003).

Os fungos fazem parte de um grupo microbiano cosmopolita, apresentando uma grande diversidade, tanto do ponto de vista morfológico e metabólico, quanto funcional. Na década de 90, foram feitos levantamentos estimativos a partir do qual se concluiu que apenas 5 % da diversidade de fungos haviam sido relatadas, com aproximadamente 69.000 espécies descritas na literatura e destas 16 % (11.500 espécies) estariam sendo cultivadas e estudadas. Sendo

assim, representam um dos grupos microbianos com maior número de espécies na natureza (HAWKSWORTH, 2001).

Nos últimos anos, novas técnicas vêm sendo aplicadas na ciência taxonômica, tais como, análise de proteínas, açúcares e muitas outras técnicas biotecnológicas, como sondas de DNA, caracterização molecular e análises genômicas, complementarmente aos estudos morfológicos, e assim, alterando o sistema de classificação dos fungos (SABIO, 2005).

Tais microrganismos podem ser organizados em diferentes grupos taxonômicos, de acordo com aspectos morfológicos, reprodutivos e filogenéticos, tais como: Ascomycota, Zigomycota, Glomeromycota, Chytridiomycota e Stramenopila (MANFIO, 2003). Durante anos de estudo, as informações acumuladas na literatura brasileira com relação aos fungos proporcionam a esse grupo de microrganismos, reconhecimento por serem uma das espécies comparativamente mais estudadas atualmente no Brasil. Várias espécies de fungos têm sido testadas e utilizadas para a produção de substâncias de interesse industrial ou médico.

De acordo com a classificação hierárquica dos fungos, o Filo Ascomycota possui 46 ordens e cerca de 6.000 gêneros. Entre eles encontram-se as formas sexuadas dos mitospóricos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. As espécies do gênero *Aspergillus* caracterizam-se por apresentar conidióforos simples, com parede celular lisa, verrugosa, hialinos ou pigmentados. São agentes oportunistas por excelência, pois podem provocar colonização em cavidades preexistentes, infecção, processos alérgicos e intoxicações, dessa forma, eles causam a maioria das infecções ocorridas em pessoas imunodeprimidas. Acredita-se na existência de 600 espécies de *Aspergillus* isolados do solo, de detritos vegetais, de alimentos e de lesões humanas e de animais (FRIDKIN e JARVIS, 1996; DIAZ GUERRA et al., 2000; MELLADO et al., 2000). *Aspergillus fumigatus* é um dos agentes causadores de infecções sistêmicas mais comuns, seguido da espécie *A. flavus*. Ambos são fungos filamentosos que podem causar aspergillose bronquiopulmonar, aspergiloma e aspergillose invasiva. De acordo com Bodey e Vartivarian (1989), tais condições são geralmente adquiridas pela inalação dos conidiósporos do fungo, os quais estão presentes no ar e são pequenos o suficiente para atingir o espaço alveolar dos pulmões podendo causar tais infecções. Entretanto, *Aspergillus flavus* mais comumente causa infecção por meio da ingestão de alimentos contaminados (RHAME, 1991).

De acordo com Klich e Pitt (1988), não é possível distinguir as espécies apenas com a análise da morfologia da colônia. Sendo assim, a análise microscópica de suas estruturas, assim como estudos fisiológicos (utilização de substrato e produção de metabólicos) são utilizados para distinguir as mais diversas espécies de *Aspergillus*. Entretanto, estudos filogenéticos e outros baseados em técnicas moleculares usados para determinar a origem comum entre as espécies,

têm sido considerados mais precisos. Por exemplo, a análise do polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD), tem demonstrado ser um rápido e confiável método aplicado em espécies de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. terreus* (RHAME, 1991; LEENDERS et. al., 1996; RATH e ANSORG, 1997).

Já o gênero *Penicillium*, também considerado universal dentre os fungos, tem a maioria das espécies como saprófitas habitantes do solo, material vegetal em decomposição, sementes e grãos (PITT, 1994). Trata-se de um gênero *Penicillium* muito conhecido por produzir uma variedade de metabólitos secundários bioativos, por isso há mais de 20 anos sua taxonomia e classificação vêm sendo revisadas, com base em dados morfológicos e bioquímicos (LARSEN et al., 2000). Estes fungos raramente têm sido relatados como agentes etiológicos de micoses em humanos (GUGLIELMINETTI et al., 2000).

As espécies do gênero *Fusarium* possuem classificação baseada nas suas características morfológicas. As principais características consideradas para designar espécies são: morfologia da colônia, pigmentação e taxa de crescimento, especificidade de hospedeiros e perfil de metabólitos secundários (THARANE, 1990). Devido à plasticidade e variações de características fenotípicas desse gênero, os marcadores morfológicos não são suficientes, o que tem levado a uma série de discordâncias na especiação desses fungos (OLIVEIRA e COSTA, 2002). Sendo assim, a sistemática molecular, que tem por base as relações filogenéticas, é uma ferramenta que oferece considerável segurança no estabelecimento de um sistema complementar de classificação para fungos, auxiliando na definição de alguns grupos taxonômicos e na designação mais precisa da posição desses microrganismos.

As diferenças entre as várias espécies de fungos é resultado da variação do material genético. Essas variações estão localizadas nos cromossomos que abrigam as unidades informacionais, que são transferidas de uma geração para outra. Sendo assim, na primeira metade do século XX, a molécula de DNA, responsável por tais informações, foi identificada e seu modelo proposto. Com esta nova informação, foram estabelecidas as tecnologias de análise molecular para estudar a variabilidade do DNA, o que permite determinar pontos de referência nos cromossomos, denominados tecnicamente de marcadores moleculares.

Ferreira e Grattapaglia (1998) definiram marcador molecular como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondentes a regiões expressas, ou não no genoma). Portanto, pode-se dizer que, atualmente, a detecção de variabilidade genética pode ser feita por meio de diferentes níveis de observações do material genético.

O comportamento de um marcador molecular, de acordo com as leis básicas de herança de Mendel, é definido como um marcador genético. Isto é feito, por exemplo, por meio do estudo do comportamento do marcador em uma população segregante. Portanto, é importante enfatizar que o fato do marcador ser DNA, ou produto da transcrição e tradução de uma seqüência de DNA, não implica em que se constitua em um marcador genético, como freqüentemente se supõe (BECKMANN, 1988).

Atualmente, encontra-se disponível uma grande variedade de técnicas de biologia molecular para a detecção de variabilidade genética, ou seja, para a obtenção de polimorfismo genético. Essas técnicas permitem a obtenção de uma quantidade ilimitada de marcadores moleculares envolvendo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados em diversas aplicações, desde estudos genéticos até no melhoramento de plantas.

Entre os principais tipos de marcadores moleculares existentes encontram-se as isoenzimas, que são formas moleculares da mesma atividade enzimática. Por apresentarem uma mesma atividade catalítica, as isoenzimas de um mesmo grupo diferem entre si na seqüência de aminoácidos que possuem. Essa técnica consiste na utilização de gel de amido e na visualização do produto enzimático através de métodos histoquímicos. Apresentam caráter de co-dominância, isto é, em um indivíduo diplóide, ambos os alelos de um *locus* são expressos e visualizados. A identificação dos alelos isoenzimáticos em gel de eletroforese é feita através da visualização do produto da reação por eles catalisada. A enzima resulta da transcrição e tradução da informação contida na fita do DNA. Devido aos alelos serem co-dominantes, a identificação do *locus* é facilitada, o que permite estimar análises das freqüências genotípicas e alélicas e, a partir destes, determinar coeficientes de diversidade gênica. Entretanto, esse marcador apresenta limitações com relação ao baixo nível de resolução de polimorfismos, não permitindo a cobertura completa do genoma e, conseqüentemente, limita os estudos em algumas áreas como, por exemplo, a construção de mapas genéticos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Uma alternativa ao uso das isoenzimas envolve o emprego dos marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), os quais foram os primeiros marcadores de DNA a serem utilizados na construção de mapas genéticos na espécie humana (BOTSTEIN et al., 1980). Em pouco tempo, os marcadores RFLP estavam entre os mais amplamente utilizados em várias áreas da genética vegetal. A técnica do RFLP é baseada na digestão do DNA genômico com enzimas de restrição. Os fragmentos de DNA gerados são separados em gel de agarose e transferidos para membranas de nylon ou nitrocelulose, onde são hibridados com sondas de DNA, detectando seqüências genômicas homólogas a elas. As sondas são seqüências de DNA marcadas com nucleotídeos radioativos ou quimioluminescentes. Após cada hibridação, as membranas contendo

os fragmentos de DNA fixados são expostos a um filme de raios-X e submetidas ao processo de revelação (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O polimorfismo é obtido quando ocorre perda ou surgimento de sítios de restrição, que são seqüências específicas de 4 a 6 nucleotídeos, reconhecidas pelas enzimas de restrição utilizadas na digestão do DNA. Inserções, deleções ou outros rearranjos, quando ocorrem entre dois sítios de restrição, também alteram o tamanho dos fragmentos, que são detectados por possuírem uma região homóloga à sonda de DNA. Esses fragmentos serão polimórficos quando apresentarem qualquer um dos rearranjos genéticos citados acima, sendo então utilizados na caracterização de indivíduos geneticamente diferentes. Os marcadores RFLP apresentam herança co-dominante, sendo possível à identificação de genótipos homozigotos e heterozigotos. Essa característica é uma das vantagens do RFLP uma vez que permite uma análise mais detalhada da ação gênica e da interação entre alelos em estudos de mapeamento de características quantitativas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Outra importante vantagem dos marcadores RFLP é o fato de representarem *loci* únicos em cada genoma e de possibilitar a utilização de sondas heterólogas, permitindo o mapeamento comparativo entre espécies correlacionadas. Manicom et al., (1990) citado por Kistler (1997), sugeriu a técnica de RFLP para a determinação de grupos genéticos e sua relação com patogenicidade. Entretanto, o uso de RFLP apresenta desvantagens por ser uma técnica demorada, com custo relativamente alto e necessitar do uso de material radioativo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O avanço das técnicas moleculares e o advento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia de Polimerase), usando uma enzima DNA polimerase termoestável e termocicladores programáveis, com elevada capacidade de processamento, imprimiram grande automatização à síntese *in vitro* de DNA. A técnica de PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de um segmento de DNA, delimitado por um par de *primers* de seqüências específicas de nucleotídeos de fita simples. *Primers* são seqüências curtas de DNA (oligonucleotídeos), que pareiam com o DNA-molde e servem de iniciadores para a síntese de uma nova fita de DNA. Tais reações ocorrem em ciclos alternados de temperatura, sendo que cada ciclo do PCR envolve três etapas. Na primeira, ocorre a desnaturação da fita dupla de DNA, posteriormente, os *primers* se anelam às seqüências complementares específicas que flanqueiam o gene alvo, e então a nova fita de DNA é sintetizada a partir das extremidades 3' – OH livres dos *primers*, por meio da enzima DNA polimerase. Como cada ciclo é repetido várias vezes, a amplificação do DNA-alvo ocorre em progressão geométrica a partir de quantidades muito reduzidas da fita de DNA-molde (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Dessa forma, a técnica de PCR consiste de uma reação de polimerização em cadeia para amplificação de seqüências de DNA por uma reação enzimática *primer* dirigida (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A tecnologia de PCR tem gerado diversas classes de marcadores moleculares que podem ser aplicados no estudo do DNA, inteiro ou fragmentado. Um destes métodos foi denominado de RAPD (WILLIAMS et al., 1990), o qual é caracterizado pela polimerização em cadeia utilizando *primers* arbitrários. Estes marcadores moleculares de RAPD (ou Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) têm sido utilizados no estudo da variabilidade entre espécies (MOLNÁR et al., 1996) e em nível de população. A detecção e a exploração de seqüências de polimorfismo de DNA ocorridos naturalmente representam um dos mais significativos desenvolvimentos na biologia molecular. O método RAPD tem sido bastante utilizado principalmente pela vantagem de ser simples e rápido e de necessitar de pequenas quantidades de DNA para dar início ao processo.

Fenótipos moleculares, gerados por RAPD, podem servir para diagnosticar níveis taxonômicos. Considerando-se um determinado *primer*, os produtos de amplificação via RAPD podem ser classificados em dois grupos: variáveis (polimórficos) e constantes (não-polimórficos). Perfis de RAPD de representantes de vários gêneros podem conter bandas comuns a um outro gênero, enquanto outras bandas podem ser exclusivas. Se várias espécies pertencentes a esse gênero forem analisadas e uma das bandas exclusivas do gênero estiver presente em todas elas, pode-se concluir que esta banda é um marcador específico de gênero. Da mesma forma, quando se tem um perfil de RAPD de espécies de um mesmo gênero, algumas bandas poderão ser compartilhadas por algumas espécies, enquanto outras poderão ser exclusivas de uma dada espécie (FUNGARO e VIEIRA, 1998). Assim, marcadores RAPD podem ser utilizados para diagnóstico molecular de diferentes níveis taxonômicos. Fragmentos polimórficos detectados entre indivíduos de uma população também podem ser utilizados para se determinar o que se chama de identidade clonal, o que normalmente é requerido em estudos envolvendo organismos de reprodução assexuada (marcadores clone-específicos).

O método de RAPD propõe que os oligonucleotídeos escolhidos ao acaso em uma seqüência de DNA, misturados com DNA genômico e DNA polimerase termoestável, submetidos a ciclos de temperaturas controláveis como os descritos para PCR, iniciassem a amplificação do DNA. Isto é, os componentes necessários à reação de polimerização eram os mesmos descritos pela PCR. Os fragmentos amplificados podiam ser visualizados em gel de agarose revelado com brometo de etídio (WILLIAMS et al., 1990) ou por meio da utilização de desoxiribonucleotídios (dNTPs) marcados radiativamente.

Devido ao fato de que a técnica RAPD baseia-se na amplificação de DNA, enquanto a técnica RFLP baseia-se na hibridização de DNA, a diferença metodológica entre as duas resulta em uma série de vantagens práticas para marcadores RAPD, tais como, a simplicidade e a rapidez. Sendo assim, esses são de quatro a seis vezes mais eficientes do que os marcadores RFLP com relação ao mapeamento de polimorfismo ligados a *locus* de resistência a doenças e 10 vezes mais

eficientes em tempo e mão-de-obra (PARAN et. al., 1991 citado por FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Além da técnica de RAPD gerar uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA, distribuídos por todo o genoma do organismo, ela ainda oferece a possibilidade de apresentar regiões de DNA repetitivo, uma vez que os *primers* são arbitrários, ao contrário das sondas RFLP, onde ocorre pré-seleção de regiões de cópia única.

Fooland et al. (1993), citado por Ferreira e Grattapaglia (1998), concluíram que a tecnologia RAPD é eficiente para a construção de mapas genéticos ao nível intra-específico e a sensibilidade na detecção de polimorfismo é também adequada para a identificação de genótipos e obtenção de perfis genômicos. Além disso, os segmentos RAPD quando amplificados e separados por eletroforese, permitem que os segmentos sejam isolados facilmente do gel, e assim, serem mantidos *in vitro*, dispensando o uso de vetores, para então serem amplificados via PCR sempre que necessário (GRATTAPAGLIA et al., 1995). Ademais, considerando o custo da técnica por dado genômico e o custo do desenvolvimento da biblioteca de sondas, a técnica RAPD apresenta um custo mais acessível do que a técnica RFLP. Outra grande vantagem é a quantidade mínima de DNA necessária para a análise genotípica de um indivíduo, sendo necessário apenas dezenas de nanogramas. Enquanto o RFLP necessita de dezenas de microgramas de DNA. A técnica RAPD dispensa instalações sofisticadas de laboratório, assim como experiências profundas na área da biologia molecular (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Entretanto, os marcadores RAPD apresentam algumas limitações. A principal delas está relacionada ao baixo conteúdo de informações genética por *locus*, ou seja, apenas um alelo é detectado através do segmento que é amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas como um alelo nulo. Uma outra limitação a ser considerada, que ocorre em alguns casos, é o desconhecimento prévio da base genética das bandas RAPD. Embora o ensaio RAPD apresente vantagens significativas na detecção da variabilidade genética, tal vantagem pode limitar-se a capacidade de se realizar a análise dos mesmos marcadores em indivíduos geneticamente distantes. Outra importante limitação nesta técnica é o fato de se obter interpretações ambíguas de algumas bandas, embora sejam fáceis e claramente interpretadas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O RAPD é interessante porque requer uma pequena quantidade de DNA que revela um grande número de marcas polimórficas, além de ser rápido e automatizado. O uso de marcadores RAPD tem-se mostrado útil nos estudos de microrganismos onde não se tem muita informação genética. A técnica é baseada na amplificação de fragmentos não específicos de DNA, em reações sucessivas de polimerização. Como descrito por Williams *et al.*, (1990), os oligonucleotídeos são construídos com seqüências aleatórias, ao contrário da PCR, revelando polimorfismos em toda a extensão do genoma. Tais polimorfismos são reconhecidos pela

presença de um fragmento amplificado em um dos genomas em relação à ausência destes mesmos fragmentos em outro. Segundo Achenbach *et al.*, (1996) citado por Oliveira e Costa, (2002), entre as técnicas de marcadores moleculares disponíveis, o uso de marcadores de RAPD é utilizado como diagnóstico para a identificação de isolados de *Fusarium solani*. Partindo-se desse princípio, pode-se estender o uso desses marcadores moleculares para o entendimento das relações filogenéticas que existem entre as espécies constituintes dos variados gêneros de fungos como, por exemplo, para *Aspergillus* e *Penicillium*, que são microrganismos que apresentam potencial de uso biotecnológico.

Recentemente a análise das regiões do DNA ribossomal e estudos comparativos de seqüências de nucleotídeos de genes do DNA ribossomal, através da técnica ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) têm sido utilizados, conforme descrito por Oliveira (2002). O valor deste método está na sua rapidez e habilidade para avaliar diferenças entre grupos filogenéticos, efetuando análises em vários níveis de classificação, inclusive em estudos de evolução, gerando novos marcadores para estudos de genética de populações (JORGENSEN e CLUSTER, 1989; OLIVEIRA, 2002).

A classificação ideal deve estar baseada na filogenia dos microrganismos. Esta interação classificação-filogenia é de grande importância, pois permite prever similaridades genéticas entre os microrganismos, fornecendo informações necessárias para a descoberta e avaliação de similaridades genéticas entre linhagens e espécies, resultando em maior compreensão da evolução das espécies de fungos utilizadas.

Segundo Bered *et al.* (1997), os marcadores genéticos poderão auxiliar na identificação de microrganismos por meio de suas diferenças genéticas. Estes marcadores podem ser divididos em morfológicos e moleculares. Os marcadores de DNA, como o RAPD, poderão contribuir no mapeamento genético de espécies de interesse e pela sua precisão em caracterizar e agrupar genótipos diferentes de várias espécies. Além disso, apresentam procedimentos simples e rápidos de execução e têm sido bastante utilizados para identificar e diferenciar linhagens de uma mesma espécie, possibilitando um rápido avanço no conhecimento da diversidade genética e contribuindo com mais um parâmetro no controle de qualidade e taxonomia de fungos.

O presente trabalho teve como objetivos determinar o perfil molecular e identificar marcadores RAPD específicos para linhagens de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Materiais e Métodos

Isolados de fungos utilizados

Para os estudos de identificação molecular, foram selecionados 24 isolados de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e, ainda, um isolado cuja identificação ainda é alvo de estudo taxonômico (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolados pertencentes a três gêneros de fungos utilizados nos experimentos de identificação molecular por meio da técnica de RAPD.

Código	Gênero
F117	<i>Aspergillus</i>
F123	Não identificado
F0099	<i>Penicillium</i>
F132	<i>Aspergillus</i>
F004	<i>Aspergillus</i>
F013	<i>Penicillium</i>
F121	<i>Aspergillus</i>
F0065	<i>Penicillium</i>
F120	<i>Aspergillus</i>
F135	<i>Aspergillus</i>
P002	<i>Fusarium</i>
F076	<i>Aspergillus</i>
F024	<i>Aspergillus</i>
F136	<i>Aspergillus</i>
F133	<i>Aspergillus</i>
F118	<i>Aspergillus</i>
F0062	<i>Penicillium</i>
F0002	<i>Aspergillus</i>
F122	<i>Aspergillus</i>
F0125	<i>Penicillium</i>
F0012	<i>Penicillium</i>
F0129	<i>Penicillium</i>
F134	<i>Aspergillus</i>
F119	<i>Aspergillus</i>

Esses fungos foram isolados de amostras de porções superficiais (cerca de 5 cm de profundidade) de solo e procedentes da reserva ecológica do IBGE, em Brasília. As coletas foram

realizadas no período de 14 a 16 de fevereiro de 2005. Todo o material foi armazenado em recipiente com isolamento térmico para a manutenção das condições de temperatura e umidade do local da coleta, até o isolamento das colônias por técnica de diluição seriada em placas de Petri contendo os meios BDA (Dextrose 40 g.L⁻¹; Ágar 30 g.L⁻¹; Infusão de batata q.s.p. 1 L) e Czapek (DIFCO).

Conservação dos fungos

Os fungos foram isolados e conservados no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Brasília – UniCeub em meio BDA em tubos de ensaio com 10 mL do referido meio de cultura. Colônias selecionadas foram repicadas, para frascos largos de vidro contendo cerca de 20 mL do meio sólido BDA e incubadas a temperatura ambiente por 72 h. Após o crescimento, foi adicionado a cada isolado cerca de 40 mL de meio de cultura líquido YG (5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 20 g.L⁻¹ de glicose), mantendo-se a temperatura ambiente por cerca de cinco dias, até obter uma quantidade de micélio suficiente para fazer a extração de DNA dos isolados de fungo em questão.

Extração de DNA dos isolados

Para se obter DNA genômico com qualidade e quantidade suficientes para as análises moleculares, utilizou-se a metodologia descrita por Azevedo et al. (2003) com algumas modificações.

Após o crescimento dos fungos em meio líquido YG, os micélios foram filtrados, com o auxílio de um funil de vidro e papel de filtro Whatman No.2, (12,3 cm de diâmetro), seguindo-se duas lavagens com água destilada autoclavada para remover o excesso do meio de cultura e secos em papel de filtro. Em seguida, os micélios foram colocados em um pedaço de papel alumínio, devidamente identificado e armazenado a -20 °C até o momento de uso. Com o auxílio de um bisturi, foi retirado cerca de um quarto da massa micelial (200 mg) de cada isolado e transferido para um tubo plástico de 1,5 mL, onde foi macerado manualmente com o auxílio de um bastão de vidro.

Ao macerado, adicionaram-se 500 µL do tampão de extração TTEsp (50 mL de sacarose 2M, 0,2 mL de β-mercaptoetanol, NaCl 100mM, SDS 0,5% e água destilada autoclavada q.s.p para 200 mL). Em seguida, foram adicionados 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e, então, o material foi submetido a agitação e armazenados no gelo por 5 minutos. Após nova agitação, procedeu-se a uma centrifugação (13.000xg por 10 minutos), coletando-se o sobrenadante, que foi novamente submetido à etapa anterior. Ao final, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico de 1,5 mL.

A concentração de NaCl foi ajustada para 300 mM, seguindo-se a adição de dois volumes de etanol 100 % gelado, e precipitação por 16 h a -20 °C. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 13.000xg por 5 minutos. O etanol foi descartado e adicionado 500 µL de etanol 70 % gelado e novamente centrifugado a 13.000xg por 5 minutos. Em seguida, o etanol foi descartado e o processo repetido novamente, descartando-se o etanol, para secagem dos DNA's à temperatura ambiente. Posteriormente, os ácidos nucléicos totais foram ressuspensos em 200 µL de TE 1 X (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8.0) sem a adição de RNase. As amostras, devidamente identificadas, foram mantidas a uma temperatura de 4 °C.

Análise quantitativa e qualitativa do DNA

Procedeu-se a análise quantitativa dos DNA's em gel de agarose 1,5 %, utilizando-se várias concentrações de DNA de fago λ (Invitrogen).

Por sua vez, a análise qualitativa dos DNA's foi realizada em gel de agarose 1,5 %, utilizando-se o marcador de massa molecular 100 pb Ladder (Invitrogen).

Para a aplicação dos DNA's nos géis de agarose utilizou-se 5 µL de tampão de amostra (glicerol 50 % (v/v); azul de bromofenol 0,25 % (p/v); xileno cianol 0,25 % (p/v) em TE 1X). Os parâmetros de eletroforese foram definidos a 160 V, 75 mA por 3 h utilizando-se o tampão de corrida TBE 1X (Tris-borato 9 mM e EDTA 1 mM).

Reações e RAPD

Com os resultados obtidos nos géis de agarose, foram selecionadas 24 amostras para a análise pela técnica de RAPD, sendo estas diluídas na faixa de 10 X a 100 X em água miliQ, para a obtenção de uma concentração final de 20 ng.µL⁻¹.

As reações de amplificação foram realizadas em 30 µL de uma mistura contendo 24,9 µL de água milliQ autoclavada, 3,0 µL de tampão 10 X (Tris-HCl 60 mM pH 8,8, KCl 500 mM e MgCl₂ 20 mM, Amersham, CA, USA), 1,2 µL de um *primer* de seqüência aleatória (Operon Technologies, Inc.) na concentração de 10 µM (Tabela 1), 0,6 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase na concentração de 1 U.µL⁻¹ (Amersham, CA, USA) e 5 µL de DNA (100 ng).

Primers de RAPD usados nas análises moleculares

Para a obtenção dos perfis de marcadores moleculares das populações de fungos analisadas nesse trabalho, foram utilizados vários *primers* (Operon Technologies, Inc.) decaméricos de composição aleatória de nucleotídeos (Tabela 2).

Tabela 2 – *Primers* de RAPD utilizados na determinação dos perfis eletroforéticos dos diversos isolados de fungos submetidos à análise molecular.

<i>Primers</i>	Seqüência (5' - 3')
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-10	GTGATCCGAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-12	TCGGCGATAG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-15	TTCCGAACCC
OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-18	AGGTGACCGT
OPA-20	GTTGGTGGCT
OPR-01	TGCGGGTCCT
OPR-02	CACAGCTGCC
OPR-04	CCCGTAGCAC
OPR-05	GACCTAGTGG
OPR-06	GTCTACGGCA
OPR-08	CCCGTTGCCT
OPR-09	TGAGCACGAG
OPR-10	CCATTCCCCA
OPR-13	GGACGACAA
	G
OPR-14	CAGGATTCCC

Condições de amplificação por RAPD

As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC-100 MJ Research) contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 94 °C, programado para 45 ciclos de desnaturação de 1 min a 93 °C, anelamento por 1 min a 35 °C e extensão por 2 min a 72 °C e uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C.

Análise por eletroforese dos fragmentos de DNA gerados por RAPD

Os produtos de amplificação originários das reações de RAPD foram separados em gel de agarose 1,5 % submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM) durante 3 h a 160 V e 75 mA. Ao término da corrida, os géis foram corados por 30 min em uma solução

corante contendo brometo de etídio ($5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ em TBE 0,5 X), decorados por 30 min em TBE 0,5 X e fotografados sob luz ultravioleta sob comprimento de onda de 300 nm. Para a documentação fotográfica, utilizou-se o sistema EagleEye II still video system™ (Stratagene). Em todos os géis, marcadores de massa molecular (100 bp Ladder - INVITROGEN) foram usados para a determinação da massa molecular dos fragmentos amplificados pela técnica de RAPD.

Análise dos Dados

Fotos das ampliações realizadas com os *primers* selecionados foram usadas para a análise do polimorfismo entre os indivíduos da população. As bandas presentes nos géis foram consideradas como marcadores RAPD. Foi gerada, então, uma matriz de similaridade levando-se em consideração as relações entre indivíduos, *primers* e massas moleculares das bandas obtidas com um dado *primer*. Utilizou-se o valor 1 para a presença de um marcador e 0 para a ausência. No caso de dúvida o número 9 foi usado como padrão. A seguir, a planilha obtida foi submetida a um programa de análise estatística multivariada para a determinação das distâncias genéticas entre os indivíduos. A matriz de similaridade foi obtida por meio do coeficiente de Jaccard (Sneath e Sokal, 1973) e que, por meio da análise por UPGMA (unweighted pair-group method analysis), produziu-se um dendrograma que evidenciou o agrupamento dos indivíduos, utilizando-se o programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versão 2.02 pc (RHOLF, 1993).

A seguir, os valores obtidos e tabelados em uma planilha foram submetidos à análise de variância molecular (AMOVA) para a determinação estatística das possíveis origens das variabilidades encontradas nas populações pela aplicação de algoritmos específicos pelo programa Arlequin ver. 2000 (SCHNEIDER et al., 2000).

Resultados e Discussão

Obtenção de massa micelial para uso nas análises moleculares

Testaram-se estratégias para a obtenção de massa micelial para a extração de DNA utilizando-se reagentes de meio de cultura de baixo custo e com rapidez, dispensando-se etapas laboriosas. Uma variação dos métodos tradicionais foi o crescimento do fungo em meio sólido BDA, seguindo-se da adição de meio líquido YG sobre a cultura, depois de constatada a esporulação.

Dos resultados obtidos, observou-se que todos os isolados desenvolveram-se em temperatura variando entre 25 °C a 28 °C e, após 5 dias de crescimento, os fungos apresentaram micélio denso com coloração esbranquiçada ou esverdeada e em quantidade para uso no procedimento de extração de DNA.

Análise do DNA genômico dos fungos

As adaptações do protocolo de extração de DNA, baseado em Azevedo et al. (2003), permitiram a produção de DNA em quantidade e qualidade suficiente para serem aplicados nas reações de amplificação por RAPD, levando-se em consideração o fato de algumas modificações, tais como, a não utilização do nitrogênio líquido para o rompimento da parede celular e a abolição dos tampões de espermidina 10 X (Espermidina 40 mM, Na₂EDTA 100 mM, Tris-base 100 mM pH 8,5) e TNE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0 e NaCl 100 mM), como também, o detergente triton X-100 10 % (p/v).

Das alterações realizadas, observou-se que a quantidade de DNA genômico visualizada nos géis foi significativa para a continuidade do procedimento molecular. Essas informações são particularmente importantes quando se deseja implementar estratégias moleculares que permitam a obtenção de informações em intervalos de tempo curto e a baixo custo sem, entretanto, comprometer a qualidade da amostra-teste.

Análise das reações de RAPD

Após a obtenção dos DNA's, estes foram submetidos às reações de amplificação por RAPD. Dos resultados obtidos, observou-se que as reações de amplificação apresentaram reprodutibilidade. Segundo Cruz e Milach (1998) e Ferreira e Grattapaglia (1998), a reprodutibilidade está fortemente associada à qualidade do DNA e à padronização das condições de reação. O número de bandas amplificadas normalmente é em função da espécie, do *primer* e das condições da amplificação. Em reações de RAPD, normalmente são amplificados fragmentos entre 500 e 2500 pb (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). No presente trabalho a maior parte dos marcadores ocorreu no intervalo de 200 e 1300 pb.

Os *primers* utilizados na análise dos vários isolados de fungos produziram diferentes perfis eletroforéticos entre os isolados. O polimorfismo obtido entre os isolados analisados permitiu identificar marcadores moleculares específicos para os gêneros de acordo com o *primer* utilizado (Figura 1). Dentre os *primers* testados, dez (OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPR-02, OPR-04, OPR-06, OPR-09 e OPR-10) produziram sinais de amplificação úteis para a identificação molecular dos três gêneros de fungos analisados nesse estudo e os demais (OPA-

12, OPA-15, OPA-17, OPA-18, OPA-20, OPR-01, OPR-05, OPR-08, OPR-13 e OPR-14) não se mostraram interessantes para uso na análise dos isolados em questão.

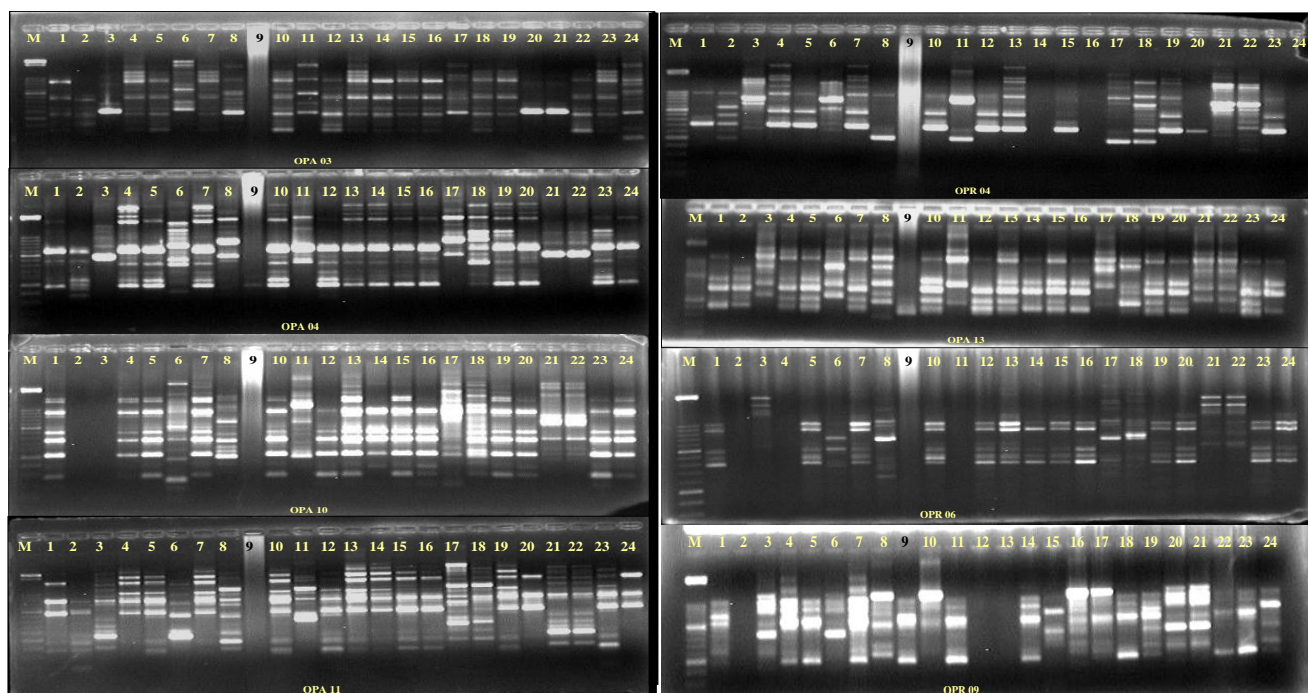


Figura 1 - Perfis eletroforéticos de isolados de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, produzidos pela utilização de vários *primers* de RAPD. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. Os números 1, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 23 e 24 correspondem aos isolados do gênero *Aspergillus*; 3, 6, 8, 17, 20, 21 e 22, isolados do gênero *Penicillium*; 11, isolado pertencente ao gênero *Fusarium*; 2, isolado de fungo não identificado.

Ao analisar o *primer* OPA-03 podemos observar a amplificação de fragmentos monomórficos de 400 pb, 800 pb e 1200 pb nos isolados 12, 13, 14, 15 e 16, sendo que todos pertencem ao gênero *Aspergillus*. Enquanto que os isolados 20 e 21, ambos pertencentes ao gênero *Penicillium* apresentaram um fragmento monomórfico de aproximadamente 500 pb.

Ao analisar o perfil de bandas do *primer* OPA-04, foi possível observar fragmentos monomórficos de 300 pb e 1100 pb, com grande intensidade e nitidez nos isolados 4, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20 e 23, porém o isolado 11 não apresentou o fragmento de 300 pb, mas apresentou um fragmento polimórfico de 1200 pb, visto que este pertence ao gênero *Fusarium*. Os isolados 4, 5, 7, 10, 12 e 23 apresentaram dois fragmentos com intensidade razoável de 400 pb e 600 pb detectando-se, portanto, marcadores moleculares específicos para o gênero *Aspergillus*.

O perfil eletroforético apresentado pelo *primer* OPA-10 evidenciou um fragmento de 900 pb no isolado 6, pertencente ao gênero *Penicillium*. Este fragmento foi encontrado nos isolados 17, 20 e 21, também pertencentes ao gênero *Penicillium*. Entretanto, os isolados 21 e 22 apresentaram fragmentos de 1.100 pb e 1.200 pb que não foram observados no isolado 6. Observou-se

também um fragmento de 1400 pb pertencente ao isolado 11, representante do gênero *Fusarium*.

O *primer* OPA-11 apresentou fragmento de 700 pb com alta intensidade entre os isolados 11 e 17, sendo que estes isolados pertencem aos gêneros *Fusarium* e *Penicillium*, respectivamente. Já o *primer* OPA-13, apresentou fragmento de amplificação de 800 pb entre os isolados 11 (*Fusarium*), 13 e 15 (*Aspergillus*), 17 e 21 (*Penicillium*) e 22 (não identificado).

Analisando-se a série de *primers* OPR, observou-se no perfil eletroforético do *primer* OPR-02 a presença de fragmentos de 600 pb, 700 pb, 800 pb, 1200 pb e 1300 pb em todos os isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

O *primer* OPR-04 apresentou sinais de amplificação, nítidos, de 300 pb entre os isolados 8, 11, 17 e 18. Além disso, foram identificados fragmentos entre 1000 pb e 2200 pb, nos isolados 4, 13 e 18, todos pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

Ao se analisar o *primer* OPR-06 observou-se um fragmento de 800 pb no isolado 6 quando comparado aos isolados 17, 20 e 21. Além disso, esse mesmo fragmento apresenta-se representado em alguns isolados do gênero *Aspergillus*. Também foram observados fragmentos de 1100 pb no isolado 6 e 17, ambos pertencem ao gênero *Penicillium*.

Já o *primer* OPR-09 apresentou sinal de amplificação de alta intensidade de 700 pb entre os isolados 3, 6, 20 e 21, todos representantes do gênero *Penicillium*, enquanto o isolado 17, também pertencente a esse gênero não apresentou tal fragmento.

Por fim, ao se analisar o perfil eletroforético do *primer* OPR-10, observou-se a presença de um fragmento de alta intensidade de 800 pb entre os isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* e os isolados 6 e 20. O isolado 22 apresentou fragmento de 700 pb e o isolado 11 apresentou banda de 500 pb com os isolados 8 e 17, ambos pertencentes ao gênero *Penicillium*.

As bandas polimórficas de intensidade e nitidez fracas que geraram dúvidas foram consideradas, atribuindo-se o número 9. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), bandas pouco consistentes ocorrem com todos os tipos de marcadores moleculares, sendo atribuídas, em ensaios RAPD, ao baixo poder do *primer* em discriminar sítios de amplificação distintos, à competição entre diferentes sítios de amplificação por substrato e enzima e aos problemas na padronização das condições de amplificação.

Análise dos dendrogramas

Os resultados obtidos por meio da análise de RAPD foram convertidos em dados binários e, a seguir, analisados pelo programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), sendo que este programa produziu uma matriz quantitativa com os dados introduzidos, utilizando o coeficiente de Jaccard. A construção do dendrograma foi realizada por meio do método de agrupamento pareado sem peso com significado aritmético.

Sendo assim, para os marcadores RAPD que geraram um dendrograma, observou-se a formação vários agrupamentos entre os isolados de fungos analisados (Figura 2).

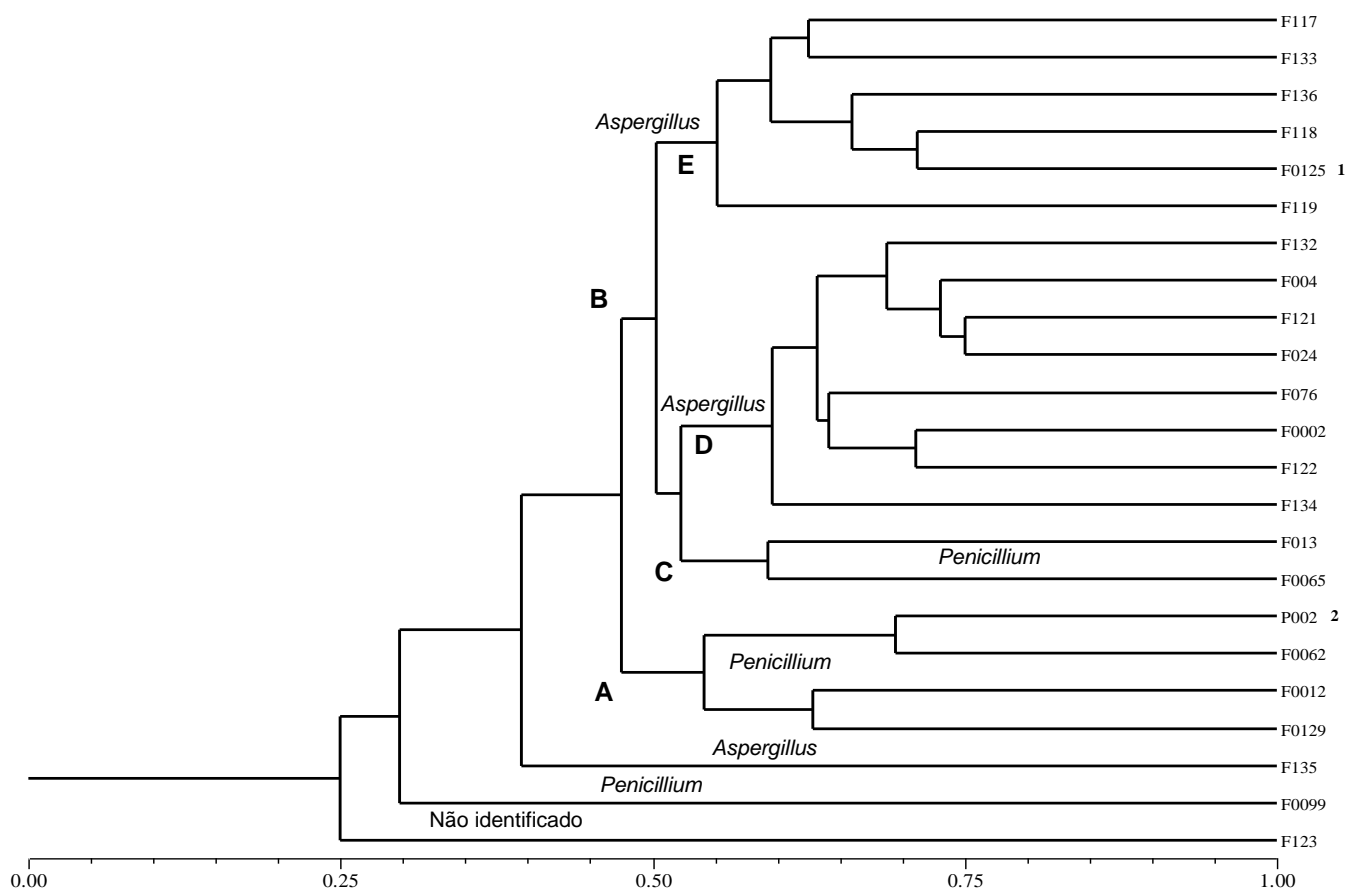


Figura 2 - Dendrograma construído por meio dos dados obtidos da reação RAPD utilizando-se 10 primers, utilizando-se isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Os códigos indicam: F117, F132, F004, F121, F120, F135, F076, F024, F136, F133, F118, F002, F122, F134 E F119, isolados de *Aspergillus*; F0099, F013, F0065, F0062, F0125 e, F0012, isolados de *Penicillium*; P002, *Fusarium*; F123, isolado de fungo não identificado. O número indica: 1, isolado de *Penicillium*; 2, isolado de *Fusarium*.

O isolado F123 apresentou 25 % de similaridade em relação aos demais isolados utilizados nesse estudo, sugerindo uma possível redefinição a respeito da classificação desse isolado.

Para o agrupamento definido como A foram encontrados os isolados de *Penicillium* que apresentaram 48 % de similaridade em relação aos isolados de *Aspergillus*. Contudo, um isolado

de *Penicillium* (F0125) foi encontrado com os isolados de *Aspergillus* do agrupamento E. No agrupamento B foram encontrados os isolados de *Aspergillus* apresentando 48 % de similaridade em relação aos isolados de *Penicillium*. Dentro do grupo B foram encontradas três divisões (C, D e E). Na divisão E foram encontrados os isolados de *Aspergillus* e um isolado de *Penicillium*.

Estes isolados apresentaram 57 % de similaridade em relação aos demais fungos analisados nesse trabalho. Essa informação sugere que maiores análises sejam feitas com o isolado F0125 para possíveis revisões taxonômicas. A divisão D foi formada apenas pelos isolados de *Aspergillus* que apresentaram 51 % de similaridade em relação aos isolados da divisão E. A divisão C foi constituída por isolados de *Penicillium* apresentando 54 % de similaridade genética. No grupo A foram encontrados os isolados de *Penicillium*. Entretanto, o isolado P002 foi identificado como sendo uma linhagem de *Fusarium*. Dessa forma, os dados moleculares sugerem que maiores estudos devem ser realizados para a redefinição desse isolado de *Fusarium*. Essa informação é reforçada pelos exemplos apontados no dendrograma, onde os isolados F135 (*Aspergillus*) e F0099 (*Penicillium*) agruparam-se diferentemente dos respectivos isolados.

A reação de amplificação por RAPD é um método sensível e eficiente na identificação de isolados muito semelhantes, no qual apresentem alto coeficiente de similaridade. No entanto, pode-se sugerir o baixo coeficiente de similaridade de 25% apresentado pelo isolado F123, não identificado morfológicamente, quando comparado aos demais gêneros estudados. Apesar do isolado não ter sido identificado de acordo com a análise das características morfológicas, provavelmente o isolado pertence a um outro gênero de fungo. O isolado F120 apresentou degradação do material genético na maioria dos perfis eletroforéticos apresentados, sendo assim, foi desconsiderada a análise filogenética desta espécie apesar de pertencer morfológicamente ao gênero *Aspergillus*.

Foram estimados os índices de similaridade para os gêneros analisados, sendo que as maiores distâncias foram obtidas, comparando-se o gênero *Fusarium* com o gênero *Aspergillus*, apresentando um coeficiente de similaridade de 69 % e 54 %, respectivamente.

Portanto, os resultados gerados por RAPD confirmaram a ocorrência de uma considerável variabilidade genética entre os fungos estudados, proporcionando dados moleculares complementares e mais precisos, quando se estuda a identificação de determinadas espécies, quando a descrição morfológica não fornece dados completos para a identificação desses isolados. Assim, os marcadores de amplificação por RAPD podem ser utilizados para diagnóstico molecular de diferentes níveis taxonômicos.

Análise de variância molecular

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) revelaram que a maior parte da fonte de variação genética (30,9 %) deveu-se à diferença de indivíduos dentro dos gêneros estudados (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de variância molecular (AMOVA) dos três gêneros de fungos estudados a partir de marcadores RAPD.

Fonte de variação	Porcentagem de variação (%)
Dentro das populações	30,90
Entre as populações	69,10

Na análise conjunta dos agrupamentos, verificou-se que 30,90 % da fonte de variabilidade genética era proveniente de variações de dentro das populações e 69,10 % da fonte de variação era proveniente de variações que ocorriam entre as populações. Portanto, a variabilidade genética foi considerada maior entre os gêneros, com relação aos grupos estudados. Sendo assim, indivíduos fenotipicamente semelhantes de uma mesma espécie, apresentam semelhanças genotípicas inferior às semelhanças genéticas encontradas entre grandes grupos de microorganismos, como os gêneros.

Os marcadores moleculares têm sido empregados como ferramentas complementares para solucionar as dúvidas que são levantadas pelos estudos taxonômicos quando se analisam linhagens de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Como exemplo, Boysen et al., 2000 reavaliaram a identidade taxonômica de 52 isolados de *P. roqueforti* coletados na Suécia por técnicas moleculares de rDNA e RAPD. As identidades dos isolados foram confirmadas por RAPD e os resultados indicaram que 48 isolados eram *P. roqueforti*, 2 eram *P. paneum* e 2 eram *P. expansum*. Geisen et al. (2001) analisaram o genótipo de 76 linhagens de *P. roqueforti* utilizando-se 3 *primers* de RAPD. Os resultados indicaram que quando os padrões de RAPD, gerados por um dado *primer*, eram comparados entre as linhagens analisadas nesse estudo, os pesquisadores observaram que a constituição genética entre as linhagens analisadas era similar. Entretanto, com um dos *primers* de RAPD, foi possível detectar duas regiões polimórficas de DNA resultando em 13 diferentes grupos. Estes grupos mostraram correspondência com relação à distribuição das linhagens. Além disso, utilizando-se os *primers* de RAPD foi possível fazer a correlação entre os perfis de RAPD e a produção de metabólitos, como também, um dos *primers* (*ari1*) permitiu diferenciar entre as linhagens de *P. roqueforti* produtoras de grandes ou pequenas quantidades de ácido micofenólico. Para os estudos moleculares de *A.*

fumigatus, Semighini et al. (2001) desenvolveram um método para a identificação de *A. fumigatus* usando RAPD. A partir de um fragmento de 1264 pb gerado por um *primer* de RAPD, foram gerados dois *primers* específicos a esta seqüência, resultando em um produto de 864 pb.

A partir dessa estratégia, 89 das 90 linhagens de *A. aspergillus* foram identificadas. Symoens et al. (2001) analisaram 43 isolados de *A. terreus* pela metodologia de RAPD. Dos 31 isolados analisados pelos primers NS3 e NS7, foram observados 23 e 24 diferentes genótipos respectivamente. Além disso, pela técnica de RAPD foi possível estabelecer uma estratégia para o monitoramento de linhagens de *A. terreus* em ambientes hospitalares. Semighini et al. (2001) usando marcadores moleculares de RFLP e RAPD analisaram quatro linhagens de *A. fumigatus* isoladas de 4 pacientes hospitalares e determinaram, pela combinação dos dois marcadores moleculares, que aquelas linhagens eram diferentes. Rath et al. (2002) usaram marcadores RAPD para a análise de 21 linhagens de *A. usutus* divididas em 11 linhagens de referência e 10 linhagens isoladas a partir de amostras de pacientes e ambientes hospitalares. As reações de RAPD discriminaram entre todas as linhagens de referência. Além disso, a comparação entre as linhagens de hospital mostrou padrões de RAPD idênticos com algumas amostras isoladas de pacientes. Yoder e Christianson (1998) analisaram 66 linhagens de *Fusarium* pela metodologia de RAPD. Os resultados de RAPD indicaram padrões intra-específicos e uniformes de bandas entre algumas linhagens de *Fusarium* independentemente da origem geográfica ou do hospedeiro/substrato. Além disso, por meio dessa estratégia molecular, uma linhagem de *Fusarium* (ATCC 20334) produziu fragmentos de RAPD idênticos a uma espécie de *Fusarium* sendo denominada, então, de *F. venenatum*. Hue et al. (1999) analisaram os padrões de RAPD de três espécies de *Fusarium*, *F. solani*, *F. moniliforme* e *F. oxysporum* e determinaram fragmentos de RAPD específicos para cada espécie que, posteriormente, foram usados para o desenho de *primers* de PCR específicos para a detecção de cada dessas espécies. Essa mesma estratégia foi adotada por Wang et al. (2001) para o desenho de *primers* de PCR espécie-específicos a partir de fragmentos gerados por RAPD para a diferenciação de *F. oxysporum cucumerinum* e *F. oxysporum luffae*. A partir do emprego da técnica de RAPD, Wilson et al. (2004) obtiveram diferenças nos padrões de fragmentos gerados entre as espécies de *F. sporotrichioides* e *F. langsethiae* permitindo diferenciá-las a partir de amostras de grãos coletados diretamente do campo.

Com o advento das técnicas de biologia molecular tornou-se possível à manipulação do DNA, culminando com o desenvolvimento de vários tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente. Eles apresentam vantagens sobre os marcadores morfológicos por fornecerem um número ilimitado de marcas distribuídas aleatoriamente ao longo de todo o genoma e, também, por serem independentes dos efeitos ambientais, permitindo a identificação precisa dos genótipos.

No caso dos fungos de importância industrial, os métodos são aplicados em duas grandes áreas. A primeira envolve a obtenção de dados mais precisos para a taxonomia, uma vez que, métodos clássicos apresentam uma limitada resolução e, a segunda aplicabilidade é a filogenia, facilitando a construção de árvores filogenéticas.

Conclusão

Os marcadores RAPD mostraram-se eficientes para detectar polimorfismos nestas espécies e podem ser utilizados como uma ferramenta complementar na obtenção de informações úteis para o manejo de coleções de culturas e no direcionamento de novas linhas de pesquisa.

A avaliação da diversidade genética utilizando marcadores moleculares tem confirmado a existência de grande variabilidade genética entre os gêneros de fungos.

As análises do dendrograma apresentaram a separação dos isolados de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, demonstrando a utilidade da técnica de RAPD na distinção de isolados dentro de gêneros diferentes, assim como, a separação morfológica, embora o gênero *Fusarium* esteja mais próximo ao gênero *Penicillium* e aparentemente distante do gênero *Aspergillus*.

A partir dos agrupamentos, pode-se sugerir os gêneros aos quais alguns isolados, não identificados morfológicamente, podem pertencer.

Maiores estudos poderão ser conduzidos para a identificação de marcas genéticas específicas para auxiliar a rápida e precisa identificação desses isolados de fungos quando em programas de melhoramento genético e biotecnológico.

Referências

AZEVEDO, M. de O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. de M.; MARANHÃO, A. Q.; DE SOUZA, T. M. (Org.). **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, DF: Editora Universidade de Brasília, 2003. 212 p.

BECKMANN, J. S. Oligonucleotide polymorphisms: a new tool for genomic genetic. **Bio/Technology**, New York, v. 6, p. 1061-1064, 1988.

BERED, F.; BARBOS, N. J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

BODEY, G. P.; VARTIVARIAN, S. Aspergillosis. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, Heidelberg, v. 8, n. 5, p. 413-437, 1989.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, US, v. 32, p. 314-331, 1980.

BOYSEN, M. E.; JACOBSSON, K.; SCHNÜRER, J. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 66, n. 4, p. 1523-1526, 2000.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **A convenção sobre a diversidade biológica**. Anexo ao decreto que promulga a Convenção sobre Diversidade Biológica/MRE. Disponível em: n<http://www.mct.gov.br/legis/decretos/2519_98.htm#1>. Acesso em: 02 de abril 2005.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a fruto e grãos do café: *Aspergillus* e *Penicillium***. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, 2003. 69p.

CRUZ, R. P.; MILACH, S. C. K. Análise de RAPD. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S. C. K. Milach, 1998. p. 107-116.

DIAZ GUERRA, M. T.; MELLADO, E.; CUENCA ESTRELLA, M.; GAZTELURRUTIAL, L.; NAVARRO, V. I. J.; TUDELA, R. L. J. Genetic similarity among one *Aspergillus flavus* strain isolated from a patient wonderment heart surgery and two environmental strains obtained from the operation room. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 6, p. 2419-2422, 2000.

DUVEILLER, E.; FUCIKOVSKY, L.; RUDOLPH, K. (Ed.). **The bacterial diseases of wheat: concepts and methods of disease management**. México: CIMMYT, 1997. p. 5-23.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 16-32.

FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 9, p. 499-511, 1996.

FUNGARO, M. H.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. 1998. p. 205-227.

GEISEN, R.; CANTOR, M. D.; HANSEN, T. K.; HOLZAPFEL, W. H.; JAKOBSEN, M. Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, NL, v. 65, p. 183-191, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F. L.; SEDEROFF, R. R. Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 90, p. 933-947, 1995.

GUGLIELMINETTI, M.; VALOTI, E.; CASSINI, P.; TAIANO, G.; CARETTA, G. Respiratory syndrome very similar to extrinsic allergic alveolitis due to *Penicillium verrucosum* in workers in a cheese factory. **Mycopathologia**, Den Haag, NL, v. 149, p. 123-129, 2000.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, Cambridge, GB, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

HUE, F. X.; HUERRE, M.; ROUFFAULT, M. A.; BIEVRE, C. Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 8, 1999.

JORGENSEN, R. A.; CLUSTER, P. D. Modes and temps in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Annual Missouri Botanical Garden**, [S.l.], v. 75, p. 1238-1247, 1989.

KISTLER, H. C. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 87, n. 4, p. 474-479, 1997. Edição do Symposium Population Genetics of Soilborne Fungal Plant Pathogens, [S.l.], 1997.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. **Transaction of the British Mycological Society**, Cambridge, GB, v. 91, p. 99-108, 1988.

LARSEN, T. O.; FRYDENVANG, K.; FRISVAD, J. C. UV-guided screening for benzodiazepine producing species in *Penicillium*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, GB, v. 28, p. 881-886, 2000.

LEENDERS, A.; VAN BELKUM, A.; JANSSEN, S.; MARIE, S.; KLUYTMANS, J.; WIELENGA, J.; LOWENBERG, B.; VERBRUGH, H. Molecular epidemiology of an apparent outbreak of invasive aspergillosis en a hematology ward. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 345-351, 1996.

MANFIO, G. P. **Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente; Campinas, SP: Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2003. Projeto Estratégia Nacional de Diversidade Biológica.

MELLADO, E.; DIAZ GUERRA, T. M.; CUENCA ESTRELLA, M.; BUENDÍA, V.; ASPA, J.; PRIETO, E.; VILLAGROSA, J. R.; TUDELA, R. L. J. Characterization of a possible nosocomial Aspergillosis outbreak. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, FR, v. 6, n. 10, p. 543-548, 2000.

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488p.

MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Milach, 1998. 140 p.

MOLNÁR, O.; PRILLINGER, H.; LOPANDIC, K. Analysis of coenzyme Q systems, monosaccharide patterns of purified cell walls, and RAPD-PCR patterns in the genus *Kluyveromyces*. **Antoine van Leeuwenhoek, Amsterdam**, NL, v. 70, n. 1, p. 67-78, 1996.

OLIVEIRA, C. V.; COSTA, S. L. J. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ANDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 631-634, 2002.

PITT, J. I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, GB, v. 32, n. 1, p. 17-32, 1994.

RATH, P. M.; ANSORG, R. Value of environmental sampling and molecular typing of aspergilli to assess nosocomial sources of aspergillosis. **Journal of Hospital Infection**, London, GB, v. 37, p. 47-53, 1997.

RATH, P. M.; PETERMEIER, K.; VERWEIJ, P. E.; ANSORG, R. Differentiation of *Aspergillus usutus* strains by random amplified polymorphic DNA. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 6, p. 2231-2233, 2002.

RHAME, F. S. Prevention of nosocomial aspergillosis. **Journal of Hospital Infection**, London, GB, v. 18, Suppl. 1, p. 466-472, 1991.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate system. Version 1.80. New York: Applied Biostatistics, 1993.

SABIO. **Noções básicas sobre fungos e classificação taxonômica**. Disponível em: <<http://www.geocities.com/~esabio/mario/nocoebasicas.htm>>. Acesso em: 21 de maio 2005.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000**: a software for populations genetics data analysis. Geneva, Switzerland: University of Geneva, Switzerland, 2000.

SEMIGHINI, C. P.; DELMAS, G.; PARK, S.; ARMSTRONG, D.; PERLIN, D.; GOLDMAN, G. H. New restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers for *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, NL, v. 31, p. 15-19, 2001.

SYMOENS, F.; BOUCHARA, J. P.; HEINEMANN, S.; NOLARD, N. Molecular typing of *Aspergillus terreus* isolates by random amplification of polymorphic DNA. **Journal of Hospital Infection**, London, GB, v. 44, p. 273-280, 2000.

THARANE, U. Grouping *Fusarium* section *Discolor* isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite production. **Journal Microbiological Methods**, St. Louis, US, v. 12, p. 23-39, 1990.

WANG, P. H.; LO, H. S.; YEH, Y. Identification of *F. o. cucumerinum* and *F. o. luffae* by RAPD-generated probes. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, GB, v. 33, p. 397-401, 2001.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acids Research**, London, GB, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WILSON, A.; SIMPSON, D.; CHANDLER, E.; JENNINGS, P.; NICHOLSON, P. Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichoides* and *Fusarium langsethiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, NL, v. 233, p. 69-76, 2004.

YODER, W. T.; CHRISTIANSON, L. M. Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, US, v. 23, p. 68-80, 1998.